

一类胰高血糖素样肽-1 受体激动剂及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一类胰高血糖素样肽-1 受体(GLP-1R) 激动剂, 具体指一类可作为非肽类 GLP-1R 激动剂的取代五元杂环衍生物小分子有机化合物, 该类化合物可用作治疗 II 型糖尿病、胰岛素不敏感、肥胖症等与糖代谢紊乱相关的疾病的药物。本发明还涉及该 GLP-1R 激动剂的制备方法。

背景技术

糖尿病(DM)是一种常见的有遗传倾向的内分泌代谢病, 主要病因是胰岛素分泌绝对或相对不足, 引起糖、脂肪、蛋白质和继发的维生素、水、电解质代谢紊乱、表现为血糖、尿糖升高, 病人表现多饮、多食、多尿、口干及全身无力等症状。人群发病率为 1%~5%, 具有日渐增高的趋势。它与癌症、心血管疾病被称为世界性三大疾病。糖尿病治疗的目的是纠正糖代谢紊乱, 以消除症状, 促进胰岛功能的恢复, 改善胰岛素抵抗, 维持较好的健康和体力, 以及防治各种并发症。

糖尿病一般分为胰岛素依赖型(I 型, IDDM)和非胰岛素依赖型(II 型, NIDDM)两类, 由于两类糖尿病的发病机制不同, 所以用药亦迥异, 分述如下。

I 型糖尿病是病毒感染对有遗传倾向的人通过免疫机制引起胰岛细胞的异常反应, 致使胰岛开始破坏至完全丧失功能。约 5% 的糖尿病为 I 型。目前治疗 I 型糖尿病的药物主要有外源性胰岛素(包括人胰岛素和动物胰岛素), 有胰岛素样作用的药物, 胰岛素样生长因子-1(IGF-1), 新长效胰岛素制剂, 金芪降糖片等。

II 型糖尿病少数是胰岛 β 细胞直接受损, 使胰岛素分泌减少。多数是上述因素造成体内肌肉、肝、脂肪组织, 对胰岛敏感性降低, 对葡萄糖摄取减少。大多数糖尿病患者为 II 型糖尿病。目前临床治 NIDDM 的药物主要有磺脲类、双胍类、其他降糖药及辅助用药等。

磺脲类降糖药物与胰腺 β 细胞膜的受体结合后, 关闭钾离子通道, 阻断钾离子外流, 导致细胞膜去极化, 促使 Ca^{2+} 通道开放, 使胞外钙离子内流, 胞内钙离子浓度增加后, 触发胰岛素的释放。按其问世先后分为两代, 第一代包括甲苯磺丙脲, 第二代有格列本脲(优降糖)、格列齐特(达美康), 格列吡嗪(美吡哒)和格列喹酮(糖适平)等。

双胍类降糖药物抑制食欲, 增加胰岛素与受体的结合, 促进细胞对葡萄糖的无氧酵解, 抑制组织呼吸, 抑制肝糖元异生。主要有二甲双胍、苯乙双胍和丁双胍。

其他降糖药主要有噻唑烷二酮类(thiazolidinediones)药物(例如曲格列酮, 罗格列酮,

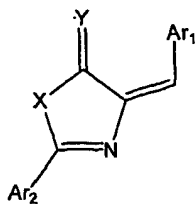
吡格列酮等), β_3 -肾上腺素受体调节剂, 胰高血糖素受体拮抗剂, 脂肪酸代谢干扰药, α -糖苷酶抑制药(例如阿卡波糖, 伏格列波糖, 米格列醇等), 醛糖还原酶抑制剂等。

最近, 对糖代谢相关内源肽激素的研究进展为糖尿病的治疗提供了新的思路。当人体摄入营养物质时, 肠内分泌细胞释放肠肽激素, 主要为胰高血糖素样肽-1 (Glucagon like Peptide-1, GLP-1) 和糖依赖的促胰岛素肽 (Glucose-dependant Insulinotropic Peptide, GIP), 并通过其对胰岛素生成、胃肠道蠕动、胰岛细胞增殖等的作用调节代谢。其中 GLP-1 由肠朗罕氏细胞分泌, 通过与胰岛 β 细胞的 GLP-1 受体 (GLP-1 Receptor, GLP-1R) 高度特异性结合, 激活腺苷酸环化酶而合成 cAMP, 并进一步激活蛋白激酶。代谢信号(糖代谢)和激酶信号(GLP-1 结合)在细胞膜水平协同作用, 最终导致 Ca^{2+} 通道开放, Ca^{2+} 内流, 并进一步刺激胰岛素分泌, 同时抑制胰高血糖素的产生, 使餐后血糖降低以维持恒定水平。GLP-1 还具有神经调节功能, 可延迟胃排空, 减少食欲。这些都对糖尿病的控制非常有利。正常情况下, GLP-1 刺激胰岛素分泌是依赖血糖浓度的, 随着血糖浓度降低, GLP-1 促胰岛素分泌作用降低, 因此, GLP-1 的降血糖作用是自限的, 不会发生低血糖, 因而, 从糖尿病治疗的角度看, 类似于 GLP-1 作用的药物是非常理想的治疗糖尿病药物。寻找 GLP-1R 的激动剂已成为国际新药开发机构的研究热点。目前, 针对 GLP-1R 的药物研究主要集中在多肽调节剂, 例如 Amylin 公司的 AC2993 已在美国申请临床 (IND), 它是 39-氨基酸多肽, 具有 GLP-1 的促胰岛素分泌作用。由于多肽药物不便口服, 易于降解, 寻找非肽类 GLP-1R 调节剂是目前研究的新方向。

发明内容

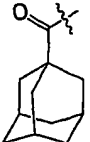
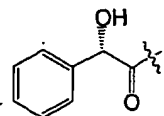
本发明的目的在于设计与合成一类新型的取代五元杂环衍生物小分子有机化合物作为胰高血糖样肽-1 受体 (GLP-1R) 激动剂, 从而为寻找抗糖尿病药物研究的先导化合物或抗糖尿病药物开辟途径。本发明的另一目的在于提供制备该类化合物的方法。

本发明所述的一类胰高血糖样肽-1 受体激动剂的具体结构如下:



其中 Ar_1 , Ar_2 各自独立地为苯基或取代苯基, 其中取代苯基中的取代基任意选自下列基团中的一个、两个或三个: 烷基; 羟基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷

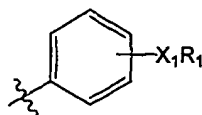
氧基或烷基基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰氧基或烷酰胺基；氧或胺取代的 C_2-C_6 的烯基、苯基、苄基、 C_2-C_6 的烯酰基、 C_3-C_6 的环烷酰基、苯甲酰基、含有包括烷氧基、烷基基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基、苄酰基、噻吩甲酰

基、叔丁氧羰基(Boc)、金刚烷甲酰基 ()、扁桃酰基 ()；烷氧基；烷基基；环烷氧基；环烷胺基；胺基；酰胺基；烷氧羰基；环烷氧羰基；烷酰氧基；烷酰胺基；环烷酰氧基；环烷酰胺基；脲基；亚脲基；烷酰基；硝基；羧基；醛基。

X 为 O、S 或者 NH。

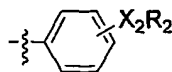
Y 为 O、S。

当 Ar_1 为



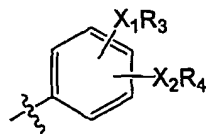
其中 R_1 为下列任意一种取代基为 H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基； C_2-C_6 的烯基； C_3-C_6 的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基； C_2-C_6 的烯酰基； C_3-C_6 的环烷酰基；苯甲酰基；叔丁氧羰基；含有包括烷氧基、烷基基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基； X_1 为 O 或者 NH 时，

Ar_2 为



其中 R_2 为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基； C_2-C_6 的烯基； C_3-C_6 的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基； C_2-C_6 的烯酰基； C_3-C_6 的环烷酰基；苯甲酰基；叔丁氧羰基；含有包括烷氧基、烷基基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基； X_2 为 O 或者 NH。

或者 Ar_2 为

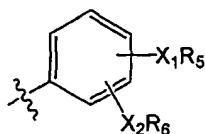


其中 R_3 , R_4 各自独立为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基； C_2-C_6 的烯基； C_3-C_6 的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤

素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；叔丁氧羰基；含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₁为O或者NH；X₂为O或者NH；

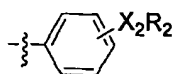
当 Ar₁ 为



其中 R₅, R₆ 各自独立为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基；C₂-C₆的烯基；C₃-C₆的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；叔丁氧羰基；含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₁为O或者NH；X₂为O或者NH时，

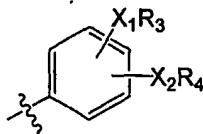
Ar₂ 为



其中 R₂ 为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基；C₂-C₆的烯基；C₃-C₆的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；叔丁氧羰基；含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₂为O或者NH。

或者 Ar₂ 为

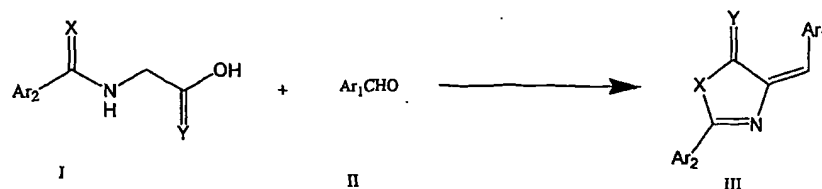


R₃, R₄ 各自独立为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基；C₂-C₆的烯基；C₃-C₆的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；叔丁氧羰基；含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₁为O或者NH；X₂为O或者NH；

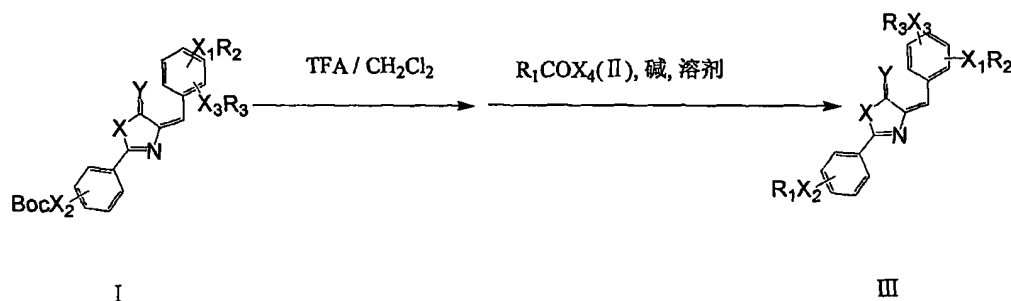
本发明通过下列步骤实施:

根据化学反应式



其中 Ar_1 , Ar_2 各自独立地为苯基或取代苯基, 其中取代苯基中的取代基任意选自下列基团中的一个、两个或三个: 硝基; 羧基; 醛基; 氧或胺取代的叔丁氧羰基, 噻吩甲酰基; X 为 O 、 S 或者 NH ; Y 为 O 或者 S 。

或者根据化学反应式



其中 R_1 , R_2 , R_3 为下列任意一种取代基: H ; 烷基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基; $\text{C}_2\text{-C}_6$ 的烯基; $\text{C}_3\text{-C}_6$ 的环烷基; 苯基; 苄基; 烷酰基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基; $\text{C}_2\text{-C}_6$ 的烯酰基; $\text{C}_3\text{-C}_6$ 的环烷酰基; 苯甲酰基; 叔丁氧羰基; 含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基; 苄酰基; 噻吩甲酰基; 金刚烷甲酰基; 扁桃酰基; X 为 O 、 S 或者 NH ; Y 为 O 或者 S ; X_1 , X_2 , X_3 各自独立为 O 或者 NH ; X_4 为 Cl 或者 OH 。

化合物 I 和 II 缩合得到化合物 III, 化合物 I 和 II 在如下溶剂中进行缩合反应: 二氯甲烷、乙酸酐、四氢呋喃、二甲基呋喃、二氯乙烷、甲苯、苯、水、二氧六环或上述溶剂的混合溶剂。有时反应还需要加入吡啶、N-甲基吗啡啉、氯甲酸异丁酸酯、三乙胺、二乙丙基乙基胺或 DMAP 等活化剂。根据具体化合物的反应情况, 反应温度一般为 -78°C 至室温 (如 Wng462 等) 或加热温度从 50°C 至 230°C (如 Wang520 等)。反应时间根据具体反应物而定。通常用 TLC 来跟踪测定反应的完成程度, 反应完毕后一般采用的后处理方法包括抽滤、浓缩反应液除尽溶剂、萃取、柱层析分离等。最终产物 III 用 NMR 来检测证明。

本发明中取代五元杂环结构单元的合成方法参阅 Organic Syntheses, CV 2, 55.

有益效果

本发明设计与合成了一类新型的非肽类胰高血糖样肽-1 受体(GLP-1R)激动剂, 与 GLP-1R 有很好的结合能力, 促进 cAMP 的合成, 可用于制成治疗 II 型糖尿病、胰岛素不敏感、肥胖症等与糖代谢紊乱相关的疾病的药物, 且克服现有的多肽调节剂药物不便口服, 易于降解等缺陷。本发明化合物结构相对简单, 易于制备。

附图说明

图 1 为化合物报告基因表达检测结果, 用以评估化合物对 GLP-1R 的激动活性, 图中以 30nM 阳性标准品 GLP-1 所诱导的荧光素酶相对活性为 100%。

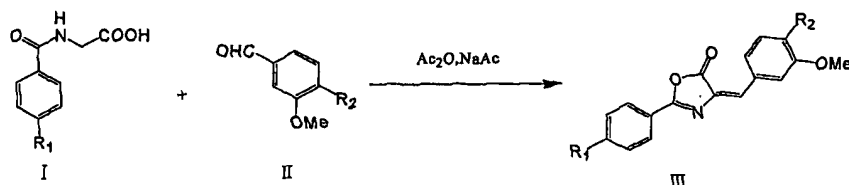
图 2 为化合物 2f 对 293/GLP-1R 细胞内 cAMP 浓度水平的影响。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述, 但不限制本发明。

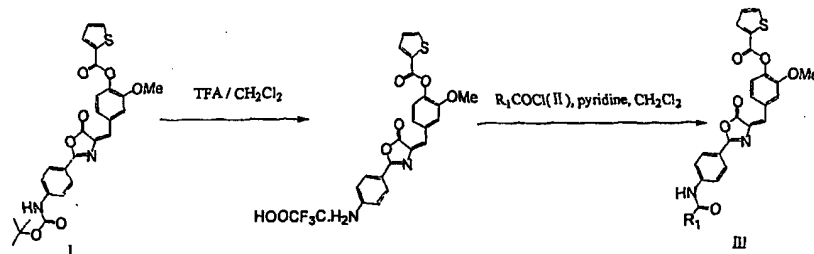
下述制备例 1-3 中化合物的制备方法主要包括以下三个反应操作:

反应操作 1:



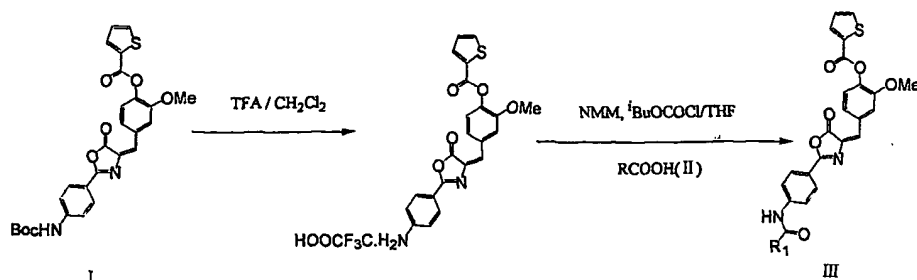
将化合物 I、化合物 II、乙酸钠和乙酸酐混合, 加热至熔融(150°C - 230°C), 保持熔融状态 1 小时, 随后加入乙醇, 冷却, 产物结晶析出。抽滤, 剩余液体浓缩, 除尽溶剂, 柱层析分离。

反应操作 2:



将化合物 I 溶于二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将底物溶于二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 依次加入吡啶、酰氯, 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 柱层析分离得产物。

反应操作 3:

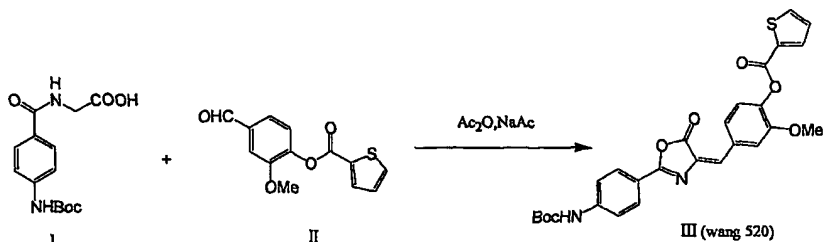


将化合物 I 溶于二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸。将化合物 II 溶于四氢呋喃 (THF) 中, -20°C 冰盐浴冷却后, 依次加入 N-甲基吗啡啉 (NMM)、氯甲酸异丁酸酯 (ClCOO^tBu)。将化合物 I 与三氟乙酸的反应产物溶于四氢呋喃, 用注射器转移至上述混合物中, 室温反应。TLC 跟踪反应, 反应结束后, 浓缩反应液, 柱层析分离得产物。

其中化合物 wang520、wang337、wang405、wang450、wang520-1、wang462-1 由反应操作 1 制备而成, 化合物 wang420、wang462、wang524、wang516、wang488、wang568、wang502、wang530、wang504、wang554、wang866、2f、wang582、wang538、wang496 由化合物 wang520 经反应操作 2 制备得到, 化合物 wang516-1、wang591 则由化合物 wang520 经反应操作 3 制备得到。

下述制备例中, NMR 用 Varian 生产的 Mercury-Vx 300M 仪器测定, NMR 定标: $\delta \text{H/C}$ 7.26/77.0 ppm (CDCl_3); $\delta \text{H/C}$ 2.50/39.51 ppm ($\text{DMSO}-d_6$); $\delta \text{H/C}$ 3.31/49.15 ppm ($\text{Methyl-}d_3 \text{ Alcohol-}d$)试剂主要由上海化学试剂公司提供, 产品纯化主要用柱色谱法, 硅胶 (200—300 目), 柱色谱法所用的硅胶型号为粗空 (ZLX-Ⅱ), 由青岛海洋化工厂分厂生产。

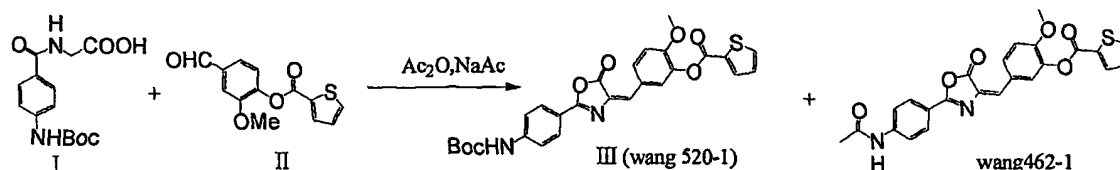
实施例 1



室温, 将化合物 II (466 mg, 1.78 mmol)、化合物 I (576 mg, 1.96 mmol)、乙酸钠 (146 mg, 1.78 mmol) 和 2 mL 醋酸酐混和。随后加热至 170°C , 体系熔融, 保持熔融状态 1 小时。之后, 加入 2 mL 乙醇, 冷却至室温, 有黄色固体析出, 抽滤。剩余液体浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (5 / 1, 体积比) 柱层析分离得产物, 共得 556 mg 产物 wang520 (产率 60%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.54 (s, 9H), 3.95 (s, 3H), 6.79 (br, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.20 (dd, J

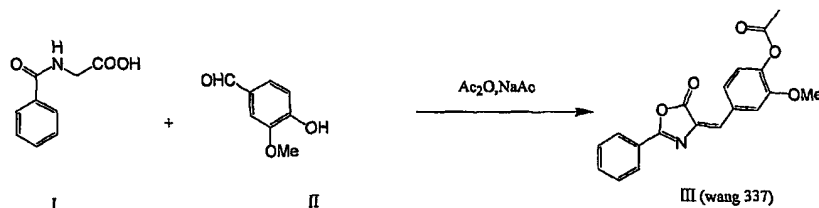
= 4.8 Hz, 3.9 Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.63 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 4.8$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, $J = 3.9$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.17 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 28.17, 55.79, 81.23, 115.28, 117.92, 119.11, 123.09, 125.74, 128.02, 129.29, 129.41, 132.18, 132.75, 133.29, 133.71, 134.99, 141.57, 143.46, 151.37, 152.08, 159.93, 163.13, 167.46.



室温, 将化合物 II (466 mg, 1.78 mmol)、化合物 I (576 mg, 1.96 mmol)、乙酸钠 (146 mg, 1.78 mmol) 和 2 mL 醋酸酐混和。随后加热至 200°C , 体系熔融, 保持熔融状态 1 小时。之后, 加入 2 mL 乙醇, 冷却至室温。液体浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (5 / 1, 体积比) 柱层析分离得 100mg wang520-1, 以石油醚 / 乙酸乙酯 (1 / 1, 体积比) 柱层析分离得 158mg wang462-1。

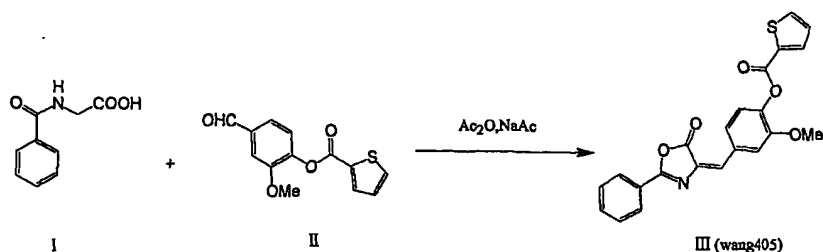
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , wang520-1) δ 1.50 (s, 9H), 3.88 (s, 3H), 7.27 (s, 1H), 7.33-7.37 (2H), 7.69 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.07 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.22-8.26 (2H), 9.93 (s, 1H)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , wang462-1) δ 2.22 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.07 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.05 (m, 1H), 8.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.19 (m, 1H)。



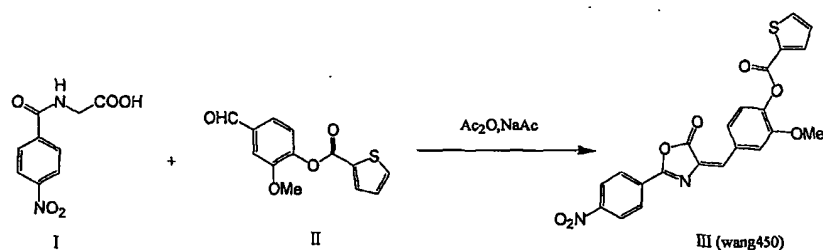
室温, 将化合物 II (1.46 g, 9.6 mmol)、化合物 I (1.9 g, 10.7 mmol)、乙酸钠 (0.8 g, 9.8 mmol) 和 2.8 mL 醋酸酐混和。随后加热至 170°C , 体系熔融, 保持熔融状态 1 小时。之后, 加入 5 mL 乙醇, 冷却至室温, 有黄色固体析出, 抽滤。得 2.0 g 产物 wang337 (产率 62%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.35 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 7.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.50-7.56 (2H), 7.59-7.65 (2H), 8.12-8.15 (3H)。



室温, 将化合物 II (262 mg, 1 mmol)、化合物 I (200 mg, 1.1 mmol)、乙酸钠 (82 mg, 1 mmol) 和 1 mL 醋酸酐混和。随后加热至 170°C, 体系熔融, 保持熔融状态 1 小时。之后, 加入 5 mL 乙醇, 冷却至室温, 有黄色固体析出, 抽滤。剩余液体浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (6 / 1, 体积比) 柱层析分离得产物, 共得 235 mg 产物 wang405 (产率 58%)。

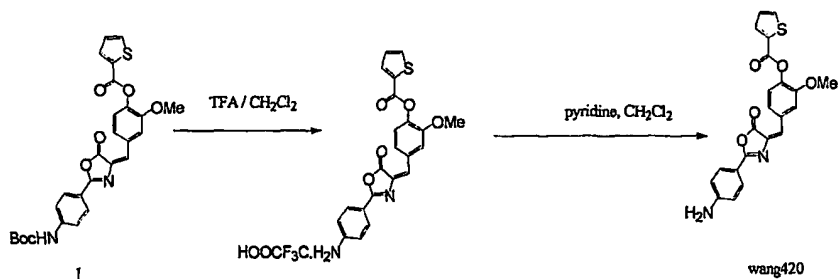
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.97 (s, 3H), 7.20 (dd, $J = 4.8$ Hz, 3.9 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.51-7.57 (2H), 7.60-7.70 (3H), 8.02 (dd, $J = 3.6$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.14-8.19 (3H)。



室温, 将化合物 II (262 mg, 1 mmol)、化合物 I (250 mg, 1.1 mmol)、乙酸钠 (82 mg, 1 mmol) 和 4 mL 醋酸酐混和。随后加热, 体系在 210°C 至 230°C 保持 1 小时。之后, 加入 5 mL 乙醇, 冷却至室温, 有黄色固体析出, 抽滤, 得 100 mg 产物 wang450 (产率 22%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.97 (s, 3H), 7.21 (dd, $J = 4.8$ Hz, 3.9 Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.73 (dd, $J = 9.9$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.40 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H)。

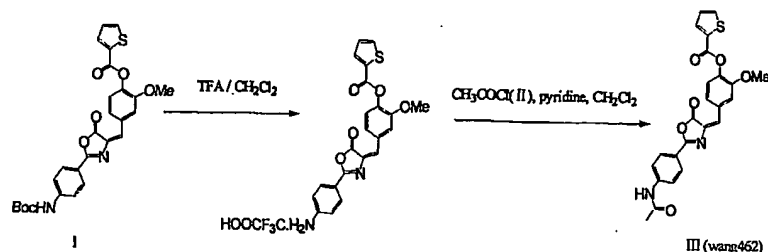
实施例 2



将化合物 I (50 mg, 0.1 mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6 mmol), 逐渐

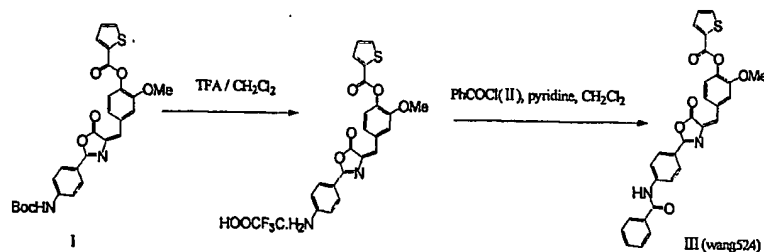
升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (2 / 1, 体积比) 柱层析分离得 38mg 产物 wang420 (产率 90%)。

^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 3.94 (s, 3H), 7.20-7.24 (m, 2H), 7.27 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 4.8$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.03 (dd, $J = 3.6$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.20 (br, 2H)。



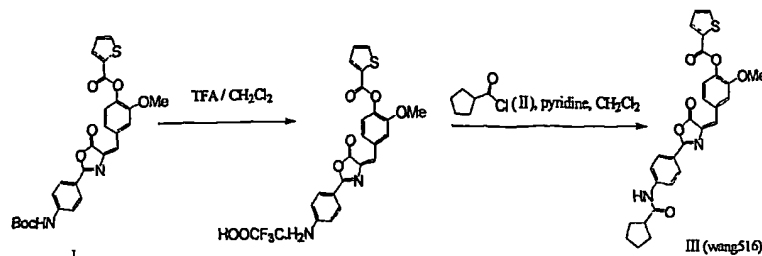
将化合物 I (50mg, 0.1mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (27 μL , 0.39mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (1.5 / 1, 体积比) 柱层析分离得 26mg 产物 wang462 (产率 56%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.19 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 7.12 (s, 1H), 7.20-7.24 (m, 2H), 7.55 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 4.8$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.77 (br, 1H), 7.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.03 (dd, $J = 3.9$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 24.66, 55.84, 155.64, 119.55, 120.54, 123.35, 126.15, 128.43, 129.59, 129.87, 132.37, 133.12, 133.52, 134.26, 135.41, 141.85, 143.13, 151.63, 160.63, 163.28, 167.60, 168.99。



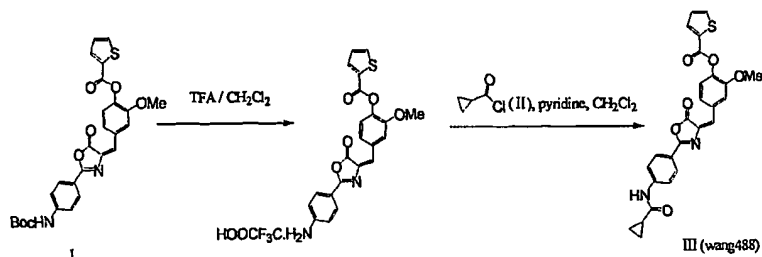
将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (23 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (5 / 1, 体积比) 柱层析分离得 15mg 产物 wang524 (产率 36%)。

^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.90 (s, 3H), 7.22 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.39-7.44 (1H), 7.50-7.58 (2H), 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.98 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.04-8.22 (7H), 10.74 (s, 1H)。



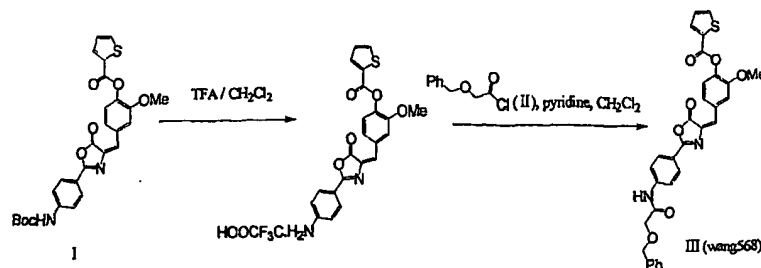
将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入 II (25 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (4 / 1, 体积比) 柱层析分离得 25mg 产物 wang516 (产率 62.5%)。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.57 (m, 2H), 1.63-1.77 (m, 4H), 1.80-1.89 (m, 2H), 2.84 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 7.31 (m, 2H), 7.40 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.94 (dd, $J=8.4$ Hz, 1.8 Hz, 1H), 8.03 (dd, $J=3.9$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.07 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.10 (dd, $J=4.8$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.18 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 10.35 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 25.62, 30.00, 55.97, 115.74, 118.71, 119.04, 123.52, 125.27, 128.51, 128.77, 129.24, 131.19, 132.78, 133.34, 135.43, 135.50, 140.86, 144.42, 151.04, 159.24, 162.91, 166.93, 175.11。



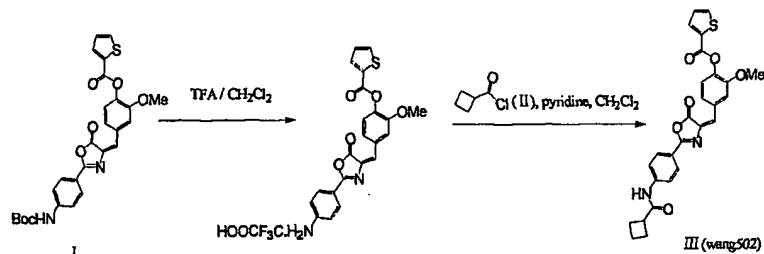
将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (23 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (4 / 1, 体积比) 柱层析分离得 25mg 产物 wang488 (产率 64%)。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.80 (m, 2H), 0.85 (m, 2H), 1.84 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.32 (dd, $J=5.1$ Hz, 3.9 Hz, 1H), 7.39 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.92 (dd, $J=8.4$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.04 (m, 1H), 8.05 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.11 (dd, $J=4.8$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.18 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 10.68 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.78, 14.83, 55.97, 115.71, 118.73, 118.93, 123.53, 125.32, 128.54, 128.81, 129.32, 131.22, 132.80, 133.36, 135.46, 135.53, 140.88, 144.24, 151.05, 159.29, 162.91, 166.96, 172.44。



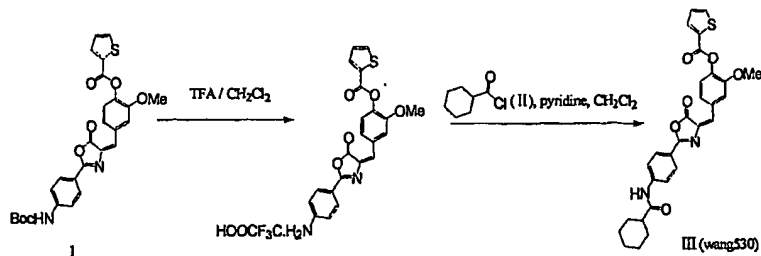
将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (23 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (4 / 1, 体积比) 柱层析分离得 26mg 产物 wang568 (产率 57%)。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.95 (s, 3H), 4.13 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.19-7.26 (m, 2H), 7.39-7.50 (m, 5H), 7.63 (dd, $J = 6.9$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 4.8$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.01 (dd, $J = 3.6$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.56 (s, 1H)。



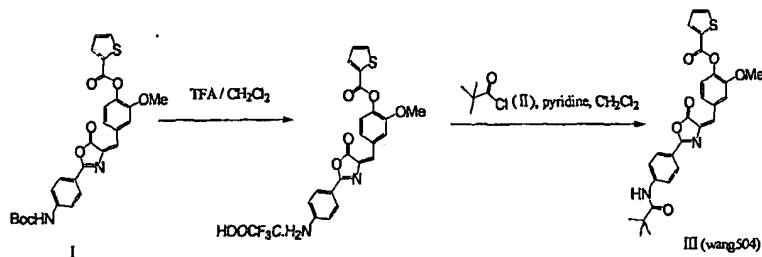
将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (23 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (4 / 1, 体积比) 柱层析分离得 22mg 产物 wang502 (产率 56%)。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.81-1.94 (m, 2H), 2.12-2.28 (m, 4H), 3.29 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 7.31 (s, 1H), 7.33 (m, 1H), 7.40 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.04-8.08 (2H), 8.12 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 10.20 (s, 1H)。



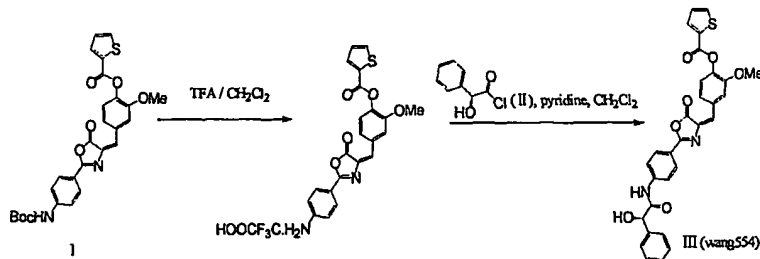
将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (23 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (4 / 1, 体积比) 柱层析分离得 24mg 产物 wang530 (产率 57%)。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.20-1.48 (6H), 1.65-1.81 (4H), 2.39 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 7.32 (s, 1H), 7.34 (m, 1H), 7.41 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 8.04 (m, 1H), 8.08 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.12 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 8.20 (m, 1H), 10.31 (s, 1H)。



将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (23 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (6 / 1, 体积比) 柱层析分离得 4mg 产物 wang504 (产率 10%)。

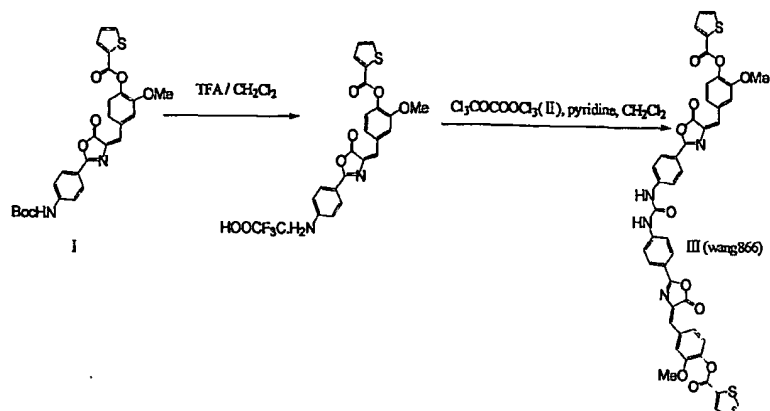
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.34 (s, 9 H), 3.94 (s, 3H), 7.15 (s, 1H), 7.20 (dd, $J=4.8$ Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.58 (br, 1H), 7.64-7.69 (2H), 7.72 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.02 (dd, $J=3.6$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.08 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.11 (d, $J=1.8$ Hz, 1H)。



将化合物 I (40mg, 0.08mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (27 μL , 0.2mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以 CH_2Cl_2 柱层析分离得 40mg 产物 wang554 (产率 89%)。

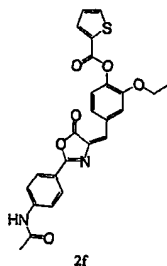
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.83 (s, 3H), 6.28 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.16 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J=$


5.1 Hz, 3.6 Hz, 1H), 7.39-7.41 (2H), 7.50-7.55 (3H), 7.60 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.71 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.99 (d, $J = 1.2$ Hz), 8.03 (dd, $J = 3.6$ Hz, 0.9 Hz, 2H), 8.24 (s, 1H), 8.42 (s, 1H)。



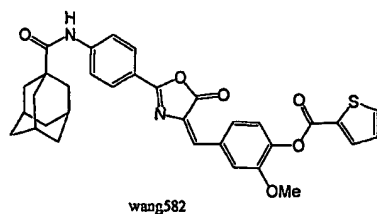
将化合物 I (52mg, 0.1mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸后, 再将反应中间体溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入吡啶 40 μL (0.6mmol), 加入化合物 II (10mg, 0.03mmol), 逐渐升至室温, TLC 跟踪反应。反应液浓缩, 除尽溶剂得初产品, 初产品以 CH_2Cl_2 柱层析分离得 19mg 产物 wang866 (产率 44%)。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.89 (s, 6H), 7.33 (dd, $J = 4.8$ Hz, 3.9 Hz, 2H), 7.36 (s, 2H), 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.93-7.96 (2H), 7.96 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 8.04 (dd, $J = 3.3$ Hz, 0.9 Hz, 2H), 8.12 (dd, $J = 4.8$ Hz, 0.9 Hz, 2H), 8.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 8.20 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 11.66 (s, 2H)。



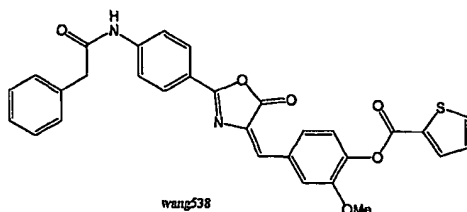
根据相同方法, 由 1eq(当量)的化合物  与三氟乙酸的反应产物和 1.5eq(当量)的乙酰氯制备 2f。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 2.24 (s, 3H), 4.18 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.19 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.62-7.70 (4H), 8.02 (m, 1H), 8.08 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H). (产率 56%)



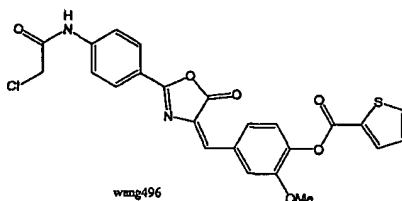
根据相同方法, 由 1eq(当量)的化合物 wang520 与三氟乙酸的反应产物和 1.5eq(当量)的金刚烷甲酰氯制备 wang582。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.76 (6H), 1.99 (6H), 2.12 (3H), 3.95 (s, 3H), 7.14-7.23 (2H), 7.54 (s, 1H), 7.61-7.70 (2H), 7.73 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.02 (dd, $J=3.9$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.12 (d, $J=1.8$ Hz, 1H). (产率 38%)。



根据相同方法, 1eq(当量)的化合物 wang520 与三氟乙酸的反应产物和 1.5eq(当量)的苄乙酰胺 II 制备 wang538。

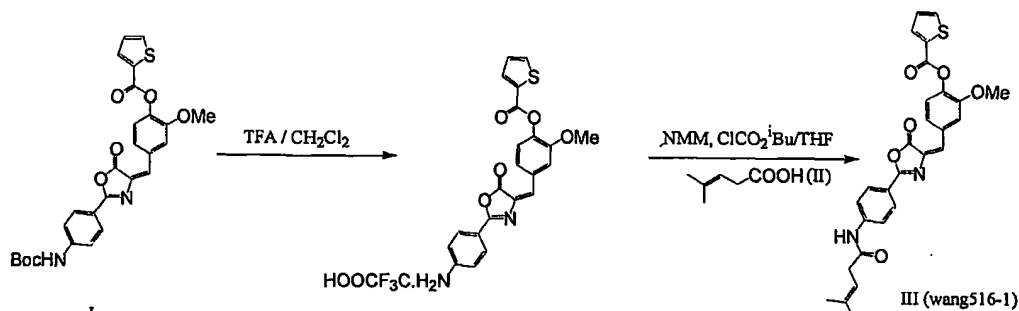
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.78 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 7.16 (s, 1H), 7.19-7.24 (2H), 7.34-7.74 (6H), 7.59 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.62 (m, 1H), 7.70 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.13 (m, 1H). (产率 58%)。



根据相同方法, 由 1eq(当量)的化合物 wang520 与三氟乙酸的反应产物和 1.5eq(当量)的氯乙酰氯制备 wang496。

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.89 (s, 3H), 4.36 (s, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.41 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.93-7.98 (2H), 8.05 (m, 1H), 8.12 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 8.22 (m, 1H), 8.89 (m, 1H), 10.95 (s, 1H). (产率 70%)。

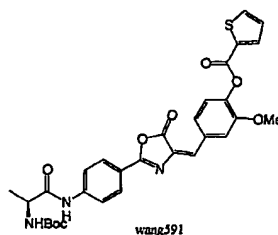
实施例 3



将化合物 I (40 mg, 0.08 mmol) 溶于 2 mL 二氯甲烷中, -20°C 冰盐浴冷却, 加入 1 mL 三氟乙酸, 逐渐升至室温, TLC 跟踪, 化合物 I 反应完全, 浓缩体系, 除尽三氟乙酸。将化合物 II (19 μL , 0.16 mmol) 溶于 2 mL 四氢呋喃中, -20°C 冰盐浴冷却, 该温度下搅拌 10 分钟后, 依次加入 N-甲基吗啡啉 (NMM) (53 μL , 0.48 mmol), 氯甲酸异丁酸酯

(ClCOO^tBu) (21 μ L, 0.16 mmol), 继续-20 $^{\circ}$ C 搅拌半小时。将化合物 I 与三氟乙酸反应产物溶于 1 mL 四氢呋喃, 用注射器转移至上述混合物中, 室温反应大约 15 小时。反应液浓缩除尽溶剂得初产品, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (5 / 1, 体积比) 柱层析分离得 12mg 产物 wang516-1 (30%)。

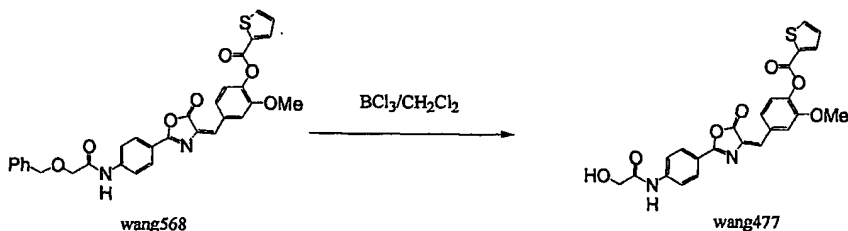
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.74 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 3.18 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 3.95 (s, 3, H), 5.42 (m, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.20-7.27 (2H), 7.63 (2H), 7.65 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 8.02 (dd, $J=3.6$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.09 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J=2.1$ Hz, 1H)。



根据相同方法, 由 1eq(当量)的化合物 wang520 与三氟乙酸的反应产物和 2eq(当量)的化合物 Boc-Ala-OH 制备 wang591。

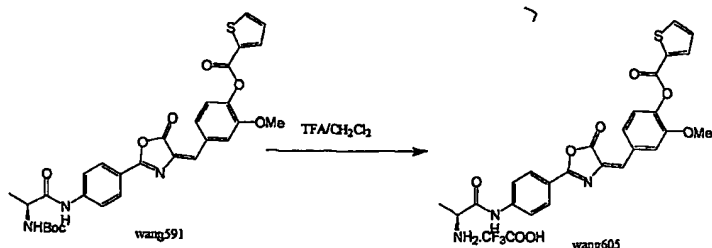
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.45 (d, $J=6.9$ Hz, 3 H), 1.48 (s, 9H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (m, 1H), 4.98 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.20 (dd, $J=4.8$ Hz, 3.9 Hz, 1H), 7.24 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J=1.8$ Hz, 7.67 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 8.02 (dd, $J=3.9$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.05 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.12 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 9.04 (br, 1H)。(产率 18%)。

实施例 4



将 wang568 (11mg, 0.02mmol) 溶于 2mL 二氯甲烷中, -78 $^{\circ}$ C 冷却 10 分钟后, 加入 0.2mL BCl_3 /正己烷 (1M) 溶液, 继续-78 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 随后升至-18 $^{\circ}$ C 反应 4 小时。加入 2mL 乙醚淬灭反应, 继续在室温搅拌 30 分钟, 随后加入 5mL 水。将水相有机相分离, 水相用二氯甲烷萃取, 合并有机相, 用无水 MgSO_4 干燥, 浓缩有机相, 初产品以石油醚 / 乙酸乙酯 (1 / 2, 体积比) 柱层析分离 wang477(1.5mg, 产率 17%)。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.86 (br, 1H), 3.95 (s, 3H), 4.26 (s, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.20 (dd, $J=8.7$ Hz, 4.8 Hz, 1H), 7.23 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J=5.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.75 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 8.14 (m, 1H), 8.57 (br, 1H)。



将 wang591 (3mg) 溶于 1.5mL 二氯甲烷中, 冰浴冷却 5 分钟, 随后加入 0.15mL 三氟乙酸, 之后逐渐升至室温反应, TLC 检测跟踪反应进程, 原料消失后, 将溶剂及三氟乙酸抽干, 得 2mg 产物 wang605 (产率 65%)。

^1H NMR (300 MHz, Methyl- d_3 Alcohol- d) δ 1.63 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.09 (m, 1H), 7.265 (s, 1H), 7.267 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.81 (dd, $J = 8.7$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.91 (dd, $J = 5.1$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.01 (dd, $J = 3.6$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 8.25 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H)。

实施例 4 生物活性测试试验

1、报告基因表达检测

当 GLP-1R 与 GLP-1 或激动剂结合后, 其 $G\alpha$ 亚单位被活化, 刺激腺苷酸环化酶, 并致细胞内 cAMP 水平升高。因前胰岛素基因的启动子区存在 cAMP 反应元件, cAMP 与该反应元件结合后, 启动前胰岛素基因转录, 从而提高胰岛 β 细胞对葡萄糖的敏感性, 促进胰岛素的表达和分泌 (Diabetes, 2000, Vol.49: 1156-1164)。筛选模型采用稳定转染 GLP-1R 受体基因表达载体和 cAMP 反应元件调节的荧光素酶报告基因表达载体的人胚肾细胞株, 检测其对被测化合物的反应 (Cell Biology, 1992, Vol.89: 8641-8645; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, Vol.84: 3434-3438)。在对化合物进行筛选时, 可诱导荧光素酶报告基因表达的, 即为具有 GLP-1 激动活性。

1.1、试验材料与仪器

细胞株: GLP-1R 和荧光素酶稳定表达的 HEK 293/GLP1R+Luc 细胞株 (国家新药筛选中心)

胎牛血清 (GIBCO/BRL 公司)

DMEM 培养基 (GIBCO/BRL 公司)

Steady-gloTM 荧光素酶分析系统 (Promega 公司)

GLP-1 标准品 (Sigma 公司)

G418 (Invitrogen 公司)

Forma 二氧化碳培养箱 (Forma 公司);

Victor 2 读板机 (Wallac 公司);

待测化合物: wang524、wang520、wang462、2f、wang516、wang516-2、wang502、wang504;

1.2 试验方法

HEK 293/GLP1R+Luc 细胞以 20000 个/100 μ l/孔接入 96 孔培养板, 以含 10% 胎牛血清和 500 μ g/mL G418 的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。待测化合物 wang516-2、wang502、wang504 分别稀释至 2mM、1mM、0.3mM、0.1 mM、0.03mM、0.01mM、0.003mM, 其余化合物从 30mM 开始以 1: 3 稀释共 8 个浓度梯度 (30mM、10mM、3mM、1mM、0.3mM、0.1mM、0.03mM、0.01mM), 然后以 1 μ l/孔加入上述 96 孔微量培养板中。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养 6h。按 Steady-gloTM 荧光素酶分析系统试剂盒说明检测荧光素酶活性, Victor 2 读板机进行读数。阳性对照选用 30nM GLP-1 标准品。

1.3 试验结果

待测化合物报告基因试验结果见图 1 及表 1:

图 1 结果表明, 终浓度为 30 μ M 的 Wang520 具有最好的相对活性 (94%), 比 2f 的活性有了很大的改善 (21%)。此外, 表 1 所示的化合物对 GLP-1R 的激动活性都具有剂量依赖性, 其中 wang520、wang516、Wang554、Wang488、Wang516-2、Wang502 及 Wang504 的半数有效剂量 (EC₅₀) 均小于 10 μ M。这一结果为确定化合物与 GLP-1R 相互作用的优势结构指明了方向。

表 1

| 化合物编号 | EC ₅₀ / μ M |
|-----------|----------------------------|
| wang524 | 46.5 |
| wang520 | 4.6 |
| wang462 | 11.6 |
| wang516 | 6.85 |
| 2f | 13.0 |
| Wang866 | 54.41 |
| Wang554 | 5.24 |
| Wang488 | 6.73 |
| Wang516-2 | 6.06 |
| Wang502 | 3.31 |
| Wang504 | 4.87 |

2、细内 cAMP 浓度测定

因上述检测通过报告基因的表达情况间接判断细胞内的 cAMP 浓度水平, 是一种间接检测方法。为确定活性化合物确实可使细胞内 cAMP 浓度升高, 直接以 cAMP 检测试剂盒进行功能性复筛。

2.1、试验材料与仪器

cAMP 检测试剂盒 (Applied Biosystems 公司)

Forma 二氧化碳培养箱 (Forma 公司)

Victor 2 读板机 (Wallac 公司)。

GLP-1R 和荧光素酶稳定表达的 HEK 293 细胞株 (国家新药筛选中心)

测定化合物: 2f

cAMP 标准品 (试剂盒自带, Applied Biosystems 公司)

2.2 试验方法

HEK 293 细胞以 20000 个/100ul/孔接入 96 孔培养板, 37°C 培养过夜, 用二甲亚砜将 2f 稀释至 1.00E-03M、1.00E-04M、1.00E-05M、1.00E-06M、1.00E-07M, 然后以 1ul/孔加入上述 96 孔微量培养板中。37°C、5%CO₂ 条件下培养 1h。按 cAMP-Screen Direct™ System 试剂盒说明检测细胞内 cAMP 浓度水平。

2.3 试验结果

细胞内 cAMP 浓度测定结果见图 2。图 2 所示的结果表明, 随着 2f 浓度的增加, 所刺激产生的 cAMP 浓度呈指数上升, 提示其作为 GLP-1R 激动剂, 对 GLP-1R 的信号传导起了一定作用。当 2f 浓度升至 30uM 和 100uM 时, cAMP 浓度呈下降趋势, 是由高浓度 2f 的细胞毒效应所致。

3、配体结合活力测试

为确定活性化合物对受体的结合能力, 制备大量表达 GLP-1R 的细胞, 以 ¹²⁵I 标记的 GLP-1 作为配基, 同时加入待检测化合物。当待测化合物与 ¹²⁵I 标 GLP-1 进行竞争性结合时, 细胞膜上的同位素标记减少。据此可评估化合物对受体的亲和力 (J Mol Endocrinol. 2000 Vol.25:321-35; J Biomol Screen. 2000 Vol.5:377-84)。

3.1 试验材料与仪器:

HEK 293/GLP1R+Luc 细胞株 (国家新药筛选中心)

标记化合物: ¹²⁵I 标记的 GLP-1 (Amersham Biosciences 公司)

Wallac MicroBata 工作站 (Perkin Elmer 公司)。

TomTech 细胞收集器 (TomTec 公司)。

测试缓冲液:

20 mM tris-HCl (pH 7.4)(上海生工生物工程技术有限公司), 100 mM NaCl(上海化学试剂公司), 15 mM NaF(上海化学试剂公司), 2 mM 脱氧吡哆醇 (deoxypyridoxine)(Sigma 公司), 0.2 mM 苯基甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride) (Sigma 公司), 抑肽酶 (aprotinin) (上海生工生物工程技术有限公司) (1 µg/ml), 亮肽酶 (leupeptin) (上海生工生物工程技术有限公司) (1 µg/ml)

洗涤溶液:

20 mM tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 15 mM NaF

闪烁液 (Wallac 公司)

待测化合物以二甲亚砜稀释, 浓度梯度为: 0.1nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM, 10000nM, 100000nM。

3.2 试验方法

取 10^5 对数生长期的 HEK 293/GLP1R+Luc 细胞, 于 25°C 条件下, 200µl 测试缓冲液中, 与 125 I 标 GLP-1 阳性肽 (终浓度 40pM) 共孵育 4 小时, 同时加入非标记阳性肽或待筛选药物。使用细胞收集器, 用洗涤溶液洗涤细胞三次。加入闪烁液, 在 Microbata 计数器上读出每孔读数。

3.3 试验结果

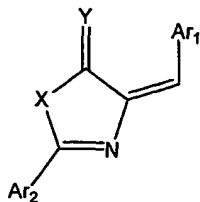
受体结合试验结果见表 3, 表 3 所示的结果表明, 2f 对 GLP-1R 具有较好的亲和活性, wang520、wang516 作用稍弱, 而其他化合物在测试的浓度范围内基本上没有结合。

表 3

| 化合物编号 | IC ₅₀ 范围 |
|---------|---------------------|
| wang524 | >100uM |
| wang450 | >100uM |
| wang405 | >100uM |
| wang327 | >100uM |
| wang520 | 60-100uM |
| wang462 | >100uM |
| wang866 | >100uM |
| wang516 | 40-80uM |
| wang420 | >100uM |
| 2f | 31 uM |

权利要求

1. 一类结构式如下的胰高血糖样肽-1 受体激动剂:



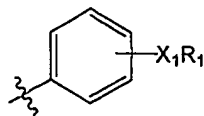
其中 Ar_1 , Ar_2 各自独立地为苯基或取代苯基, 其中取代苯基中的取代基任意选自下列基团中的一个、两个或三个: 烷基; 羟基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷氧基或烷胺基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰氧基或烷酰胺基; 氧或胺取代的 C_2-C_6 的烯基、苯基、苄基、 C_2-C_6 的烯酰基、 C_3-C_6 的环烷酰基、苯甲酰基、含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基、苄酰基、噻吩甲酰基、叔丁氧羰基、金刚烷甲酰基、扁桃酰基; 烷氧基; 烷胺基; 环烷氧基; 环烷胺基; 胺基; 酰胺基; 烷氧羰基; 环烷氧羰基; 烷酰氧基; 烷酰胺基; 环烷酰氧基; 环烷酰胺基; 脲基; 亚脲基; 烷酰基; 硝基; 羧基; 醛基;

X 为 O、S 或者 NH;

Y 为 O、S。

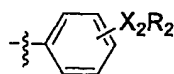
2. 根据权利要求 1 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂, 其特征在于:

当 Ar_1 为



其中 R_1 为下列任意一种取代基: H; 烷基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基; C_2-C_6 的烯基; C_3-C_6 的环烷基; 苯基; 苄基; 烷酰基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基; C_2-C_6 的烯酰基; C_3-C_6 的环烷酰基; 苯甲酰基; 含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基; 叔丁氧羰基; 苄酰基; 噻吩甲酰基; 金刚烷甲酰基; 扁桃酰基; X_1 为 O 或者 NH 时,

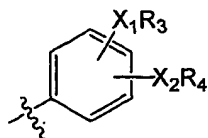
Ar_2 为



其中 R_2 为下列任意一种取代基: H; 烷基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基; C_2-C_6 的烯基; C_3-C_6 的环烷基; 苯基; 苄基; 烷酰基; 含有包括卤素原子、烷氧

基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；叔丁氧羰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；X₂为O或者NH；

或者 Ar₂ 为

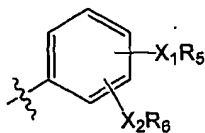


其中 R₃, R₄ 各自独立为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基；C₂-C₆的烯基；C₃-C₆的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；含烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个取代苯甲酰基；叔丁氧羰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₁为O或者NH；X₂为O或者NH。

3. 根据权利要求1所述的胰高血糖样肽-1受体激动剂，其特征在于：

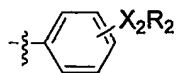
当 Ar₁ 为



其中 R₅, R₆ 各自独立为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基；C₂-C₆的烯基；C₃-C₆的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基；叔丁氧羰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₁为O或者NH；X₂为O或者NH时，

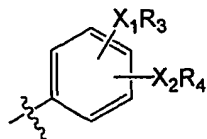
Ar₂ 为



其中 R₂ 为下列任意一种取代基：H；烷基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基；C₂-C₆的烯基；C₃-C₆的环烷基；苯基；苄基；烷酰基；含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基；C₂-C₆的烯酰基；C₃-C₆的环烷酰基；苯甲酰基；含烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个取代苯甲酰基；叔丁氧羰基；苄酰基；噻吩甲酰基；金刚烷甲酰基；扁桃酰基；

X₂为O或者NH；

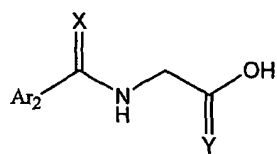
或者 Ar_2 为



R_3 , R_4 各自独立为下列任意一种取代基: H; 烷基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基; C_2-C_6 的烯基; C_3-C_6 的环烷基; 苯基; 苄基; 烷酰基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基; C_2-C_6 的烯酰基; C_3-C_6 的环烷酰基; 苯甲酰基; 含烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个取代苯甲酰基; 叔丁氧羰基; 苄酰基; 噻吩甲酰基; 金刚烷甲酰基; 扁桃酰基;

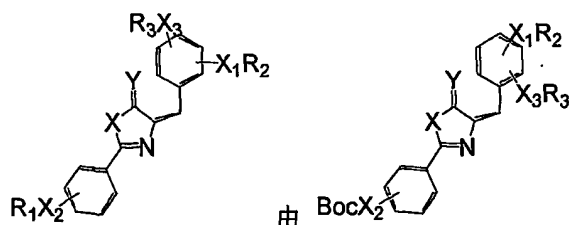
X_1 为 O 或者 NH; X_2 为 O 或者 NH。

4. 权利要求 1 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂的制备方法, 其特征在于由化合物



和 Ar_1CHO 缩合制得, 其中 Ar_1 , Ar_2 各自独立地为苯基或取代苯基, 其中取代苯基中的取代基任意选自下列基团中的一个、两个或三个: 硝基; 羧基; 醛基; 氧或胺取代的叔丁氧羰基, 噻吩甲酰基; X 为 O、S 或者 NH; Y 为 O 或者 S。

5. 权利要求 1 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂的制备方法, 其特征在于化合物



与三氟乙酸的反应物和化合物 R_1COX_4 缩合制得, 其中 R_1 , R_2 , R_3 为下列任意一种取代基: H; 烷基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷基; C_2-C_6 的烯基; C_3-C_6 的环烷基; 苯基; 苄基; 烷酰基; 含有包括卤素原子、烷氧基或羟基在内的取代烷酰基; C_2-C_6 的烯酰基; C_3-C_6 的环烷酰基; 苯甲酰基; 叔丁氧羰基; 含有包括烷氧基、烷胺基在内的任意一个、两个或者三个基团取代的苯甲酰基; 苄酰基; 噻吩甲酰基; 金刚烷甲酰基; 扁桃酰基; X 为 O、S 或者 NH; Y 为 O 或者 S; X_1 , X_2 , X_3 各自独立为 O 或者 NH; X_4 为 Cl 或者 OH。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂的制备方法, 其特征在于缩合反应溶剂为二氯甲烷、乙酸酐、四氢呋喃、二甲基呋喃、二氯乙烷、甲苯、苯、水、二氧

六环或上述溶剂的混合溶剂。

7. 根据权利要求 4 或 5 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂的制备方法, 其特征在于反应温度为 -78°C 至室温或加热温度从 50°C 至 230°C 。

8. 根据权利要求 4 或 5 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂的制备方法, 其特征在于缩合反应时用吡啶、三乙胺、二乙丙基乙基胺、DMAP、N-甲基吗啡啉、氯甲酸异丁酸酯作活化剂。

9. 权利要求 1 所述的胰高血糖样肽-1 受体激动剂用作治疗 II 型糖尿病、胰岛素不敏感、肥胖症等与糖代谢紊乱相关的疾病的药物。

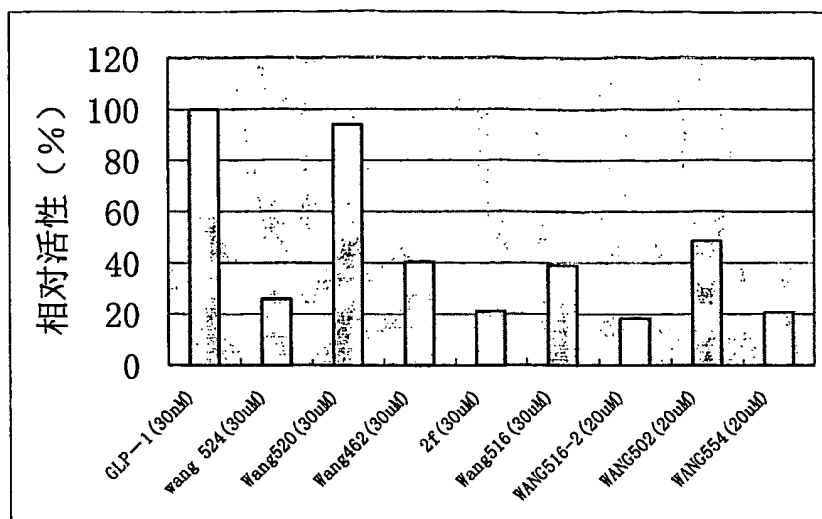


图 1

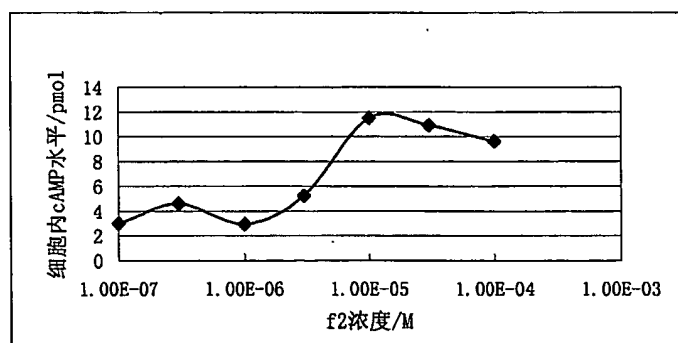


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/01115

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D263/42 C07D263/46 C07D277/34 C07D277/36 C07D233/70 C07D233/84 A61K31/4164
A61K31/421 A61K31/426

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C07D263 C07D277 C07D233

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRS, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CA, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | JP3-50532A, 5. Mar. 1991 (05.03.91) specification p3 table1 | 1 |
| X | JP9-244229A, 19. Sep. 1997 (19.09.97) specification p8-9 | 1 |
| X | JP11-273865A, 8.Oct. 1999 (08.10.99) specification p5 | 1 |
| X | Shafi, P. M. et al., "A new synthetic route to 4-arylidene-2-phenyl-2-imidazolin-5-ones", Indian J. Chem., Sect. B:Org. Chem. Incl. Med. Chem., 1999, 38B(3), p378-379 | 1,4,6-8 |
| X | Agarwal, Rajesh et al., "Synthesis of 2-aryl-1-(4-morpholinophenyl)-4-(3,4-disubstituted-benzylidene)imidazolin-5-ones as CNS active agents", Indian J. Chem., Sect. B, 1983, 22B(3), p308-310 | 1-4,6-8 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|--|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
18. Mar. 2004 (18.03.2004)

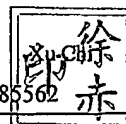
Date of mailing of the international search report

08 · APR 2004 (08 · 04 · 2004)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Telephone No. 86-10-62085562



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/01115

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Follenius-Wund, Anny et al., "Fluorescent derivatives of the GFP chromophore give a new insight into the GFP fluorescence process", Biophysical Journal, 2003, 85(3), p1839-1850 | 1-3 |
| A | WO03050098A, 19. Jun. 2003 (19.06.2003) | 1-9 |
| X | JP53-84968A, 26. Jul. 1978 (26.07.78) | 1 |
| X | US4912221A, 27. Mar. 1990 (27.03.90) | 1, 4,6-8 |
| X | Chemical Abstracts, CAN: 134:115892, "Synthesis of 1,2,4-trisubstituted 2-imidazolin-5-ones", CAS RN: 52900-70-6 | 1 |
| X | Chemical Abstracts, CAN: 132:265133, "A convenient synthesis of 4-arylidene-2-phenyl-5-oxazolones catalyzed by KF-Alumina.", CAS RN: 14326-80-8 | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/01115

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family members(s) | Publication date |
|---|------------------|--------------------------|------------------|
| US4912221A | 1990-03-27 | GB2224277A | 1990-05-02 |
| | | FR2638744A | 1990-05-11 |
| | | JP02180870A | 1990-07-13 |
| | | DE3935910A | 1990-05-03 |
| | | FR2640522A | 1990-06-22 |

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN03/01115

A. 主题的分类

C07D263/42 C07D263/46 C07D277/34 C07D277/36 C07D233/70 C07D233/84 A61K31/4164

A61K31/421 A61K31/426

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC7 C07D263 C07D277 C07D233

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

CPRS, EPODOC, WPI, PAJ, CNKI, CA, STN

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求编号 |
|------|--|-----------|
| X | JP3-50532A, 5.3 月 1991 (05.03.91) 说明书第 3 页表 1 | 1 |
| X | JP9-244229A, 19.9 月 1997 (19.09.97) 说明书第 8-9 页 | 1 |
| X | JP11-273865A, 8.10 月 1999 (08.10.99) 说明书第 5 页 | 1 |
| X | Shafi, P. M. 等, "A new synthetic route to 4-arylidene-2-phenyl-2-imidazolin-5-ones", Indian J. Chem., Sect. B:Org. Chem. Incl. Med. Chem., 1999, 38B(3), 378-379 页 | 1,4,6-8 |
| X | Agarwal, Rajesh 等, "Synthesis of 2-aryl-1-(4-morpholinophenyl)-4-(3,4-disubstituted-benzylidene)imidazolin-5-ones as CNS active agents", Indian J. Chem., Sect. B, 1983, 22B(3), 308-310 页 | 1-4,6-8 |
| X | Follenius-Wund, Anny 等, "Fluorescent derivatives of the GFP chromophore give a new insight into the GFP fluorescence process", Biophysical Journal, 2003, 85(3), 1839-1850 页 | 1-3 |
| A | WO03050098A, 19.6 月 2003 (19.06.2003) | 1-9 |

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

18.3 月 2004 (18.03.2004)

国际检索报告邮寄日期

08.4 月 2004 (08.04.2004)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

授权官员



电话号码: 86-10-62085562

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/01115

| C(续). 相关文件 | | |
|------------|---|-----------|
| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落 | 相关的权利要求编号 |
| X | JP53-84968A, 26.7 月 1978 (26.07.78) | 1 |
| X | US4912221A, 27.3 月 1990 (27.03.90) | 1, 4, 6-8 |
| X | 美国化学文摘, CAN: 134:115892, "Synthesis of 1,2,4-trisubstituted 2-imidazolin-5-ones", CAS RN: 52900-70-6 | 1 |
| X | 美国化学文摘, CAN: 132:265133, "A convenient synthesis of 4-arylidene-2-phenyl-5-oxazolones catalyzed by KF-Alumina.", CAS RN: 14326-80-8 | 1 |

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/01115

| 检索报告中引用的 专利文件 | 公布日期 | 同族专利成员 | 公布日期 |
|------------------|------------|-------------|------------|
| US4912221A | 1990-03-27 | GB2224277A | 1990-05-02 |
| | | FR2638744A | 1990-05-11 |
| | | JP02180870A | 1990-07-13 |
| | | DE3935910A | 1990-05-03 |
| | | FR2640522A | 1990-06-22 |